

禾谷缢管蚜鞣化激素基因克隆及功能分析

刘孝明[#], 燕赛英[#], 孙成贤, 高杜军, 杜孟芳, 安世恒^{*}, 尹新明^{*}

(河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要:【目的】探讨禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) 鞣化激素基因的发育表达模式及功能。【方法】采用转录组测序得到禾谷缢管蚜鞣化激素基因 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* cDNA 序列。通过实时荧光定量 PCR 方法, 分析该基因的发育表达模式。利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 介导 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 沉默, 分析鞣化激素的功能。【结果】序列分析结果显示, 禾谷缢管蚜鞣化激素 α 亚基基因 (*bursicon-α*) cDNA 序列开放阅读框为 480 bp, 编码 159 个氨基酸残基; β 亚基基因 (*bursicon-β*) cDNA 序列开放阅读框为 417 bp, 编码 138 个氨基酸残基。时序表达分析表明, 鞣化激素两个亚基基因在禾谷缢管蚜整个发育期均有表达, 以 1 龄若蚜期表达量最高; 成蚜有翅个体中表达量显著高于无翅个体。RNAi 介导的 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 沉默均能显著抑制禾谷缢管蚜成蚜表皮的黑化。【结论】研究结果表明, 鞣化激素在禾谷缢管蚜体壁黑化中发挥着重要作用。该结果为进一步研究鞣化激素在蚜虫生长发育过程中的生理功能提供了基础资料。

关键词: 禾谷缢管蚜; 鞣化激素; 表皮鞣化; 发育表达模式; 荧光定量 PCR; RNA 干扰

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2015)02-0103-12

Molecular cloning and functional analysis of bursicon genes in *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae)

LIU Xiao-Ming[#], YAN Sai-Ying[#], SUN Cheng-Xian, GAO Du-Jun, DU Meng-Fang, AN Shi-Heng^{*}, YIN Xin-Ming^{*} (College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to explore the developmental expression pattern and functional analysis of bursicon genes *bursicon-α* and *bursicon-β* in *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus). 【Methods】 In this study, the cDNA sequences encoding *bursicon-α* and *bursicon-β* were obtained from RNA-seq transcriptome sequencing of *R. padi*. The expression patterns of *bursicon-α* and *bursicon-β* are analyzed by real-time quantitative PCR and the functional analyses of *bursicon-α* and *bursicon-β* were carried out through RNA interference technology. 【Results】 The sequence analysis showed that the open reading frame (ORF) of *bursicon-α* from *R. padi* is 480 bp in length, encoding a protein with 159 amino acid residues. The ORF of *bursicon-β* is 417 bp in length, encoding a protein with 138 amino acid residues. The developmental expression patterns showed that *bursicon-α* and *bursicon-β* were ordinarily expressed during the whole developmental stage of *R. padi*, and arrived at the highest expression level in the 1st instar nymph. The expression levels of these two genes in winged adult aphids were significantly higher than those in wingless adult aphids. RNA interference-mediated knockdown of *bursicon-α* and *bursicon-β* significantly inhibited the cuticular melanization of adult aphids. 【Conclusion】 These results revealed that bursicon plays an important role in the process of the cuticular melanization in *R. padi*, providing a foundation for further study for the physiological functions of bursicon in aphids.

Key words: *Rhopalosiphum padi*; bursicon; cuticular tanning; developmental expression pattern; real-time quantitative PCR; RNA interference

昆虫的体壁具有高等动物骨骼和皮肤的双重作用, 它由表皮、真皮细胞和底膜 3 部分组成, 是昆虫

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172156); 农业部“948”项目(2013-Z33); 河南省财政厅农业科技创新项目(30600309)

作者简介: 刘孝明, 男, 1989 年生, 河南商丘人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: liuxiaoming0318@126.com; 燕赛英, 女, 1989 年生, 湖南常德人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化和分子生物学, E-mail: yansaiying200707@163.com

[#] 共同第一作者 Authors with equal contribution

^{*} 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: xinmingyin@hotmail.com; anshiheng@aliyun.com

收稿日期 Received: 2014-10-27; 接受日期 Accepted: 2014-12-11

硬化的外骨骼。外骨骼能够保持昆虫的体形和着生体壁肌,并有防止体内水分蒸发和外来物质入侵的作用。然而硬化的外骨骼也限制了昆虫的生长,所以为了生长,昆虫必须周期性蜕掉旧表皮而形成新的表皮(Riddiford *et al.*, 2000)。新形成的表皮通常是柔软的,这有利于虫体的生长,但免疫防御能力较低,所以必须迅速鞣化(黑化和硬化),以便保护虫体。Fraenkel 和 Hsiao(1962)以及 Cottrell(1962)对刚羽化的红头丽蝇 *Calliphora erythrocephala* 颈部进行结扎处理,发现颈部结扎的红头丽蝇胸部和腹部的表皮不能正常黑化。随后又从发育正常的红头丽蝇体内抽取血淋巴,注射入颈部结扎的红头丽蝇体内,这些红头丽蝇胸部和腹部的表皮即迅速变黑。因而 Fraenkel 和 Hsiao(1965)推断血淋巴中存在一种能促使新羽化的丽蝇表皮鞣化的因子,并将这种因子命名为鞣化激素(bursicon)。

自从被发现以来,鞣化激素一直被认为是昆虫激素研究的难点,在被发现(Cottrell, 1962; Fraenkel and Hsiao, 1962)后的 40 年中没有很大的进展,甚至连基因也没有获得。随着 DNA 测序技术的发展以及黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 基因组全序列的破译(Adams *et al.*, 2000), Dewey 等(2004)首次发现了黑腹果蝇编码鞣化激素 BURS 亚基的基因 CG13419,同时还发现,在刚羽化的黑腹果蝇中,鞣化激素不仅能够促进新合成表皮的鞣化,还能调控翅的伸展。随后 2 个研究组 Luo 等(2005)和 Mendive 等(2005)几乎同时发现,鞣化激素是由两个胱氨酸结合蛋白组成的一种异源二聚体,其中一个亚基即为 BURS(α),另一个亚基 PBURS(β)在黑腹果蝇中由 CG15284 基因编码。迄今在节肢动物昆虫纲的双翅目、鳞翅目、鞘翅目、膜翅目、半翅目、直翅目等(Dewey *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Van Loy *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2008; 杨科等, 2012; Tanaka *et al.*, 2014), 甲壳纲(Wilcockson *et al.*, 2008)和蛛形纲,甚至在棘皮动物中都发现存在鞣化激素(Van Loy *et al.*, 2007)。

对鞣化激素功能的研究主要集中在其能够调控新羽化成虫表皮的鞣化和翅的延展,具体的作用机制被认为是鞣化激素首先同 LGR2 受体(Leu-rich repeats-containing G protein-coupled receptor, 富含亮氨酸重复序列的一种 G 蛋白受体)结合,促进 cAMP 的大量合成,激活下游 PKA 的活性,从而促进了酪氨酸羟化酶的磷酸化,活化后的酪氨酸羟化酶将酪氨酸转变为多巴,从而引起昆虫表皮的鞣化;同时鞣

化激素经由 cAMP/ PKA 信号转导路径,引起昆虫翅真皮细胞的凋亡,促进翅的成熟和延展(Eriksen *et al.*, 2000; Baker and Truman, 2002; Mendive *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2007)。此外,已有研究结果表明,昆虫体内一些细胞中存在有 BURS 亚基和 PBURS 亚基的同源二聚体(Luo *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2008),而且这些同源二聚体可能调控昆虫的免疫反应(An *et al.*, 2008; An *et al.*, 2012)。

鞣化激素从 1962 年被发现到现在已经有 50 多年,但同昆虫蜕皮激素和保幼激素相比,有关研究还相对较少,且主要集中在黑腹果蝇、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 等模式昆虫中,对蚜虫等其他昆虫报道不多,禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) 属半翅目蚜科,是小麦等多种禾谷类作物上普遍发生的一种害虫,在我国广泛分布,是小麦蚜虫的优势种(李素娟等, 2000),对小麦的产量和品质影响很大。本研究以禾谷缢管蚜为材料,采用转录组测序得到其鞣化激素基因 cDNA 序列,通过实时荧光定量 PCR 方法研究该基因的发育表达模式,利用 RNA 干扰技术分析鞣化激素的功能,以期为进一步研究鞣化激素在蚜虫生长发育及免疫防御中的生理功能提供基础资料,为害虫的防治寻找新的靶标。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和主要试剂

禾谷缢管蚜为河南农业大学实验室饲养种群,使用小麦或液体饲料饲养(李彩霞等, 1997),饲养温度为 $24 \pm 1^\circ\text{C}$,相对湿度为 60% ~ 80%,光周期为 16L: 8D。液体饲料饲养方法是采用双层石蜡膜(parafilm)夹营养液法(Bradley, 1956)。

主要试剂:荧光定量试剂盒(SYBR Primer Script RT-PCR Kit)、反转录试剂盒(PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit)、载体 pMD18-T、限制性内切酶(*EcoR* I 和 *Hind* III)以及大肠杆菌 DH5 α 均购自 TaKaRa 公司,总 RNA 抽提试剂(Trizol Reagent)、MEGA Script RNAi Kit 购自 Ambion。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

取供试禾谷缢管蚜样品,采用 Trizol 法提取总 RNA,用紫外分光光度计检测其纯度和浓度。根据反转录试剂盒说明,取 1 μg 总 RNA 样品合成 cDNA 第一链。

1.3 引物设计

根据转录组测序(数据未发表)得到的禾谷缢管蚜鞣化激素基因 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 序列,利

用 Primer 5.0 软件设计引物,引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。引物及具体用途见表 1。

表 1 本研究引物序列列表
Table 1 List of the primer sequences used in this study

引物用途 Primer use	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences
荧光定量 PCR 引物 Primers for qPCR	Rho-bursRTF1	CCACTCGCAAGATTATTCACA
	Rho-bursRTR1	ACCTAGCAGTCACGATCACCC
	Rho-pbursRTF1	CTTGGACGGCTTCAAAGGACAT
	Rho-pbursRTR1	TCAATCTTACGCCATCGGGATC
	Rho-18SF1	CGCAAAGACCTGGTGACTC
	Rho-18SR1	CTGCCTTCCTTGGATGTGG
RNAi 引物 Primers for RNA interference	Rho-bursRNAiF1	ATGTCTACCATCAACCAGGAA
	Rho-bursRNAiR1	GCTCATCAGCGGCATAGTTAG
	Rho-pbursRNAiF1	CAATAAACTTTATTGGCATC
	Rho-pbursRNAiR1	GTGTAAGAGCAATAATTCTC
	EGFP RNAiF1	CCTGAAGTTCATCTGCACCAC
	EGFP RNAiR1	CTCCAGCAGGACCATGTGATC
	Rho-bursT7RNAiF1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGTCTACCATCAACCAGGAA
	Rho-bursT7RNAiR1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTCATCAGCGGCATAGTTAG
	Rho-pbursT7RNAiF1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGACAATAAACTTTATTGGCATC
	Rho-pbursT7RNAiR1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGTAAAGAGCAATAATTCTC
	EGFPT7RNAiF1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGACCTGAAGTTCATCTGCACCAC
	EGFPT7RNAiR1	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCAGCAGGACCATGTGATC

1.4 序列分析及进化树构建软件

对禾谷缢管蚜 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 基因序列进行分析。利用 DNAMAN 进行 ORF 预测及蛋白质翻译;蛋白理化性质预测采用蛋白组学在线 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析,蛋白质的结构域采用 SMART 在线软件分析。运用 NCBI BLAST Network Server 在 GenBank 中对豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* (Harris) 等多种昆虫的 *bursicon-α* 和 *bursicon-β* 基因氨基酸序列与禾谷缢管蚜该基因氨基酸序列进行同源性比对,利用生物软件 MEGA5.1 分析其演化关系,采用 Neighbor-joining (NJ)法构建系统进化树。

1.5 实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR)

qPCR 采用相对定量的方法计算,以禾谷缢管蚜 18S rRNA 为内参基因,按照试剂盒 SYBR Primer Script RT-PCR Kit 方法,在 Mastercycler[®] ep Realplex Real-time PCR 检测系统上进行操作,反应条件如下:95℃ 预变性 10 min;95℃ 15 s,58℃ 15 s,68℃ 20 s,共 40 个循环;95℃ 15 s,58℃ 15 s,95℃ 15 s 用于

记录溶解曲线。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法,其中: $\Delta C_t = C_{t\text{目标基因}} - C_{t\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{样品}} - \Delta C_{t\text{参照物}}$ (Livak and Schmittgen, 2001)。Real-time PCR 实验技术重复 3 次。

1.6 禾谷缢管蚜鞣化激素的时间表达分析

分别取不同龄期[1 龄、2 龄、3 龄、4 龄若蚜、1 日龄成蚜、2 日龄成蚜(有翅成蚜、无翅成蚜)]的禾谷缢管蚜各 50 头,为一个生物学重复,每龄期重复 3 次。分别提取总 RNA,反转录,以 Rho-bursRTF1 和 Rho-bursRTR1 以及 Rho-pbursRTF1 和 Rho-pbursRTR1 为引物,以 18S rRNA 为内参基因进行荧光定量 PCR,分析不同发育时期鞣化激素的转录表达水平。相对定量计算方法同第 1.5 节。

1.7 RNA 干涉

先将目的基因 RNAi 片段与 pMD18-T 载体连接,经测序验证正确后,根据 MEGA Script RNAi Kit 说明书体外合成 *burs* dsRNA(*dsburs*)和 *pburs* dsRNA(*dspburs*),以 *EGFP* dsRNA(*dsEGFP*)为对照。将合成的 dsRNA 分别与蚜虫液体饲料混匀,终浓度 15 ng/μL,饲喂 2 龄禾谷缢管蚜若蚜 36 h,然后再将蚜

虫转移到新鲜的小麦上生长至成蚜第 2 天,观察其表型变化,用超景深三维成像系统拍照,随后同时分别取样,每个样品取 20 头活虫,生物学重复 3 次,分别提取样品总 RNA,反转录,进行荧光定量 PCR 检测干涉效果,方法同第 1.6 节。

2 结果

2.1 禾谷缢管蚜鞣化激素 cDNA 序列分析及系统进化树构建

序列分析表明,禾谷缢管蚜 *bursicon-α* 基因 cDNA 开放阅读框为 480 bp,编码 159 个氨基酸残基,预测的蛋白相对分子质量为 17 491.2 Da,等电点为 7.96,预测信号肽位于第 1 – 23 位氨基酸;*bursicon-β* 基因 cDNA 开放阅读框为 417 bp,编码 138 个氨基酸残基,预测的蛋白相对分子质量为 15 559.8 Da,等电点为 4.86,预测信号肽位于第 1 –

22 位氨基酸。

利用 SMART 在线软件分析禾谷缢管蚜鞣化激素氨基酸序列中含有 CT 结构域(C-terminal cysteine knot-like domain,CT domain),该结构域有利于形成二聚体结构。*bursicon-α* 氨基酸序列可能含有 1 个 CT 结构域,分布于第 41 – 129 位氨基酸,长度为 89 aa(图 1);*bursicon-β* 氨基酸序列亦可能含有 1 个 CT 结构域,分布于第 40 – 134 位氨基酸,长度为 95 aa(图 2)。Blastx 搜索结果发现,鞣化激素 2 个亚基与其他昆虫相对应的氨基酸序列具有较高的一致性,证明所获得的基因为鞣化激素基因。

将所得到的禾谷缢管蚜鞣化激素 α 亚基氨基酸序列与已知昆虫纲和节肢动物门甲壳纲水蚤 *Daphnia arenata*,棘皮动物紫海胆 *Strongylocentrotus purpuratus* 鞣化激素 α 亚基进行氨基酸序列比对分析(图 3)。基于 α 亚基的氨基酸序列,在 MEGA5.1 软件中采用 NJ 法进行聚类分析,并构建系统进化

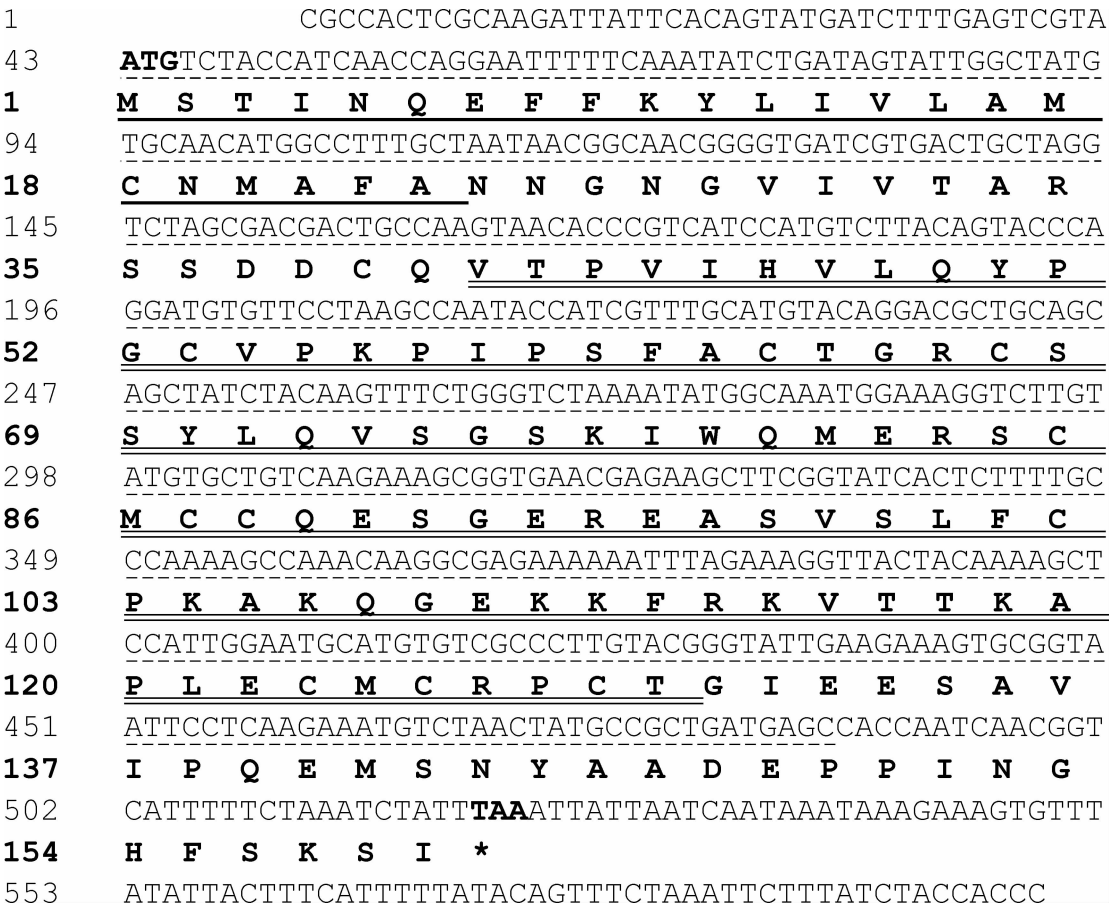


图 1 禾谷缢管蚜鞣化激素 α 亚基基因序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *bursicon-α* from *Rhopalosiphum padi*
核苷酸序列粗体处分别为起始密码子和终止密码子,虚下划线处为 RNAi 序列;氨基酸序列单下划线处为预测的信号肽序列,双下划线处为预测的 CT 结构域。The bold nucleotide sequences are initiation codon and termination codon, respectively; the dashed underline shows RNAi sequence. The single underlined amino acid sequence represents the predicted signal peptide sequence, and the double underlined amino acid sequence indicates the predicted CT domain sequence.

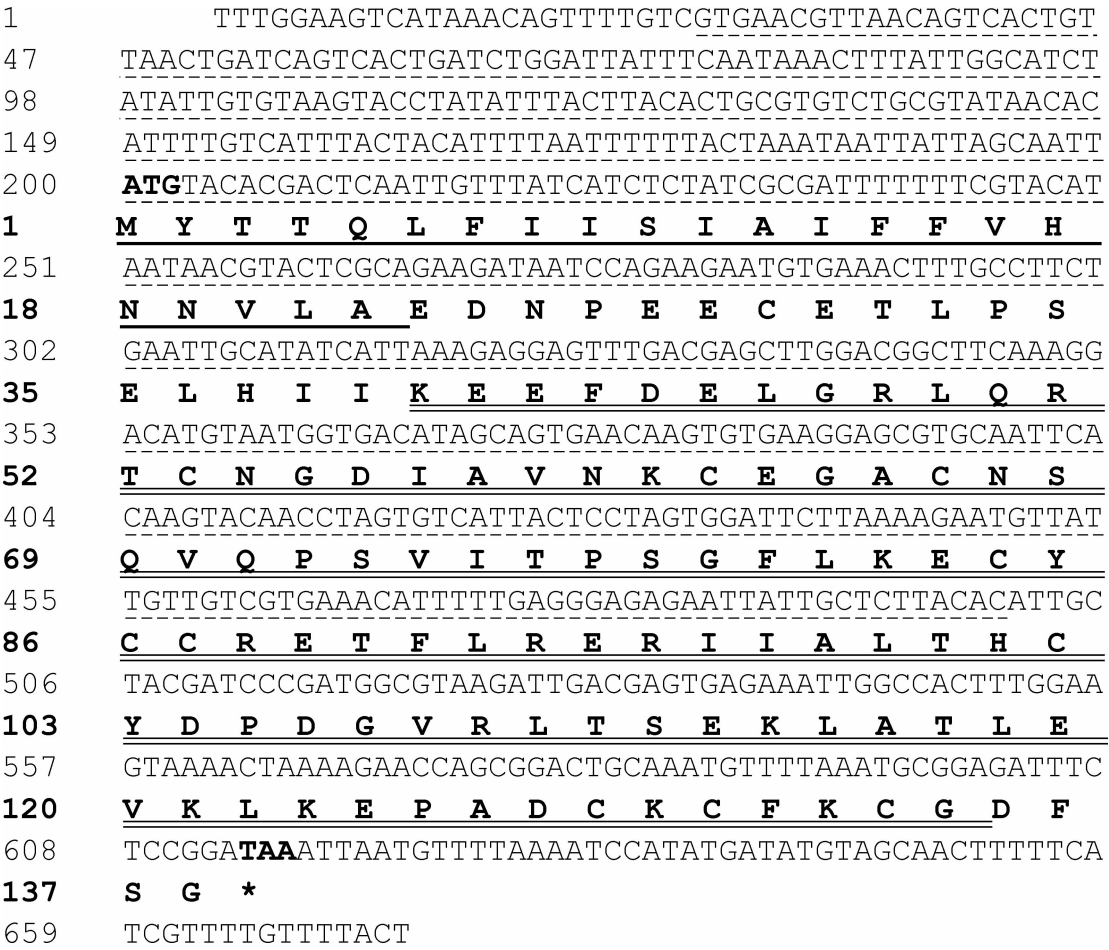


图2 禾谷缢管蚜鞣化激素 β 亚基基因序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *bursicon-β* from *Rhopalosiphum padi*

核苷酸序列粗体处分别为起始密码子和终止密码子，虚下划线处为 RNAi 序列；氨基酸序列单下划线处为预测的信号肽序列，双下划线处为预测的 CT 结构域。The bold nucleotide sequences are initiation codon and termination codon, respectively; the dashed underline shows RNAi sequence. The single underlined amino acid sequence represents the predicted signal peptide sequence, and the double underlined amino acid sequence indicates the predicted CT domain sequence.

树(图5)。由图5可以看出,禾谷缢管蚜鞣化激素 α 亚基与半翅目昆虫豌豆蚜和褐飞虱的 Bursicon-α 亲缘关系较近,与甲壳纲水蚤和棘皮类动物紫海胆的 Bursicon-α 亲缘关系较远,这与 α 亚基氨基酸序列多重联配分析结果相符(图3)。

将所得到的禾谷缢管蚜鞣化激素 β 亚基氨基酸序列与已知昆虫纲和节肢动物门甲壳纲蓝蟹 *Callinectes sapidus*、欧洲龙虾 *Homarus gammarus*、水蚤 *D. arenata*、棘皮动物紫海胆 *S. purpuratus* 等鞣化激素 β 亚基进行氨基酸序列比对分析(图4)。基于 β 亚基的氨基酸序列,在 MEGA5.1 软件中采用 NJ 法进行聚类分析,并构建系统进化树(图6)。由图6可知,禾谷缢管蚜 β 亚基与半翅目昆虫豌豆蚜和褐飞虱的 Bursicon-β 亲缘关系较近,与甲壳纲和棘皮类动物紫海胆的 Bursicon-β 亲缘关系较远,这与 β 亚基氨基

酸序列多重联配分析结果相符(图4)。

2.2 禾谷缢管蚜鞣化激素基因发育表达模式

荧光定量 PCR 结果显示,鞣化激素 α 亚基和 β 亚基基因在禾谷缢管蚜不同发育阶段均有表达,但表达量有所不同。两个亚基基因的表达趋势相似,1 龄若蚜表达量最高,2 龄之后开始下降,随后几乎稳定表达直到成虫(图7: A)。2 日龄成蚜有翅与无翅相比,α 亚基和 β 亚基基因均在有翅成蚜中表达量显著高于无翅成蚜(图7: B)。

2.3 RNAi 介导的鞣化激素基因沉默对禾谷缢管蚜表型的影响

通过体外合成 *dsburs*, *dspburs* 和 *dsEGFP*,与液体饲料混匀饲喂蚜虫,以 *dsEGFP* 为对照。荧光定量 PCR 结果显示,饲喂 *dsburs* 和 *dspburs* 的蚜虫对应目的基因的表达量与对照相比显著降低(图8)。

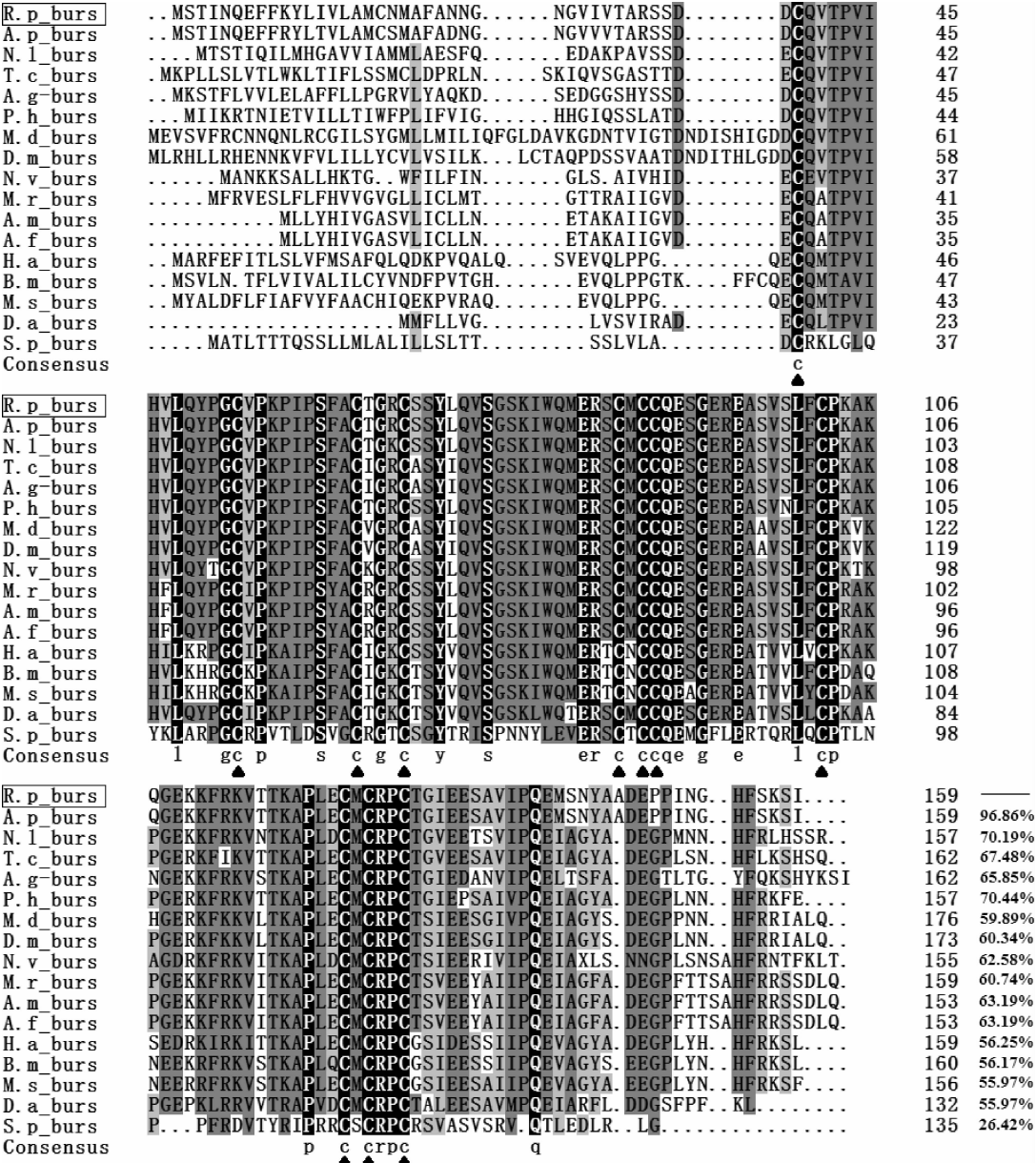


图3 禾谷缢管蚜和其他物种鞣化激素 α 亚氨基酸序列的多重联配

Fig. 3 Multiple sequence alignments of amino acid sequences of bursicon- α from *Rhopalosiphum padi* and other species

种名及其鞣化激素 α 亚基基因 GenBank 序列号 Species name and GenBank accession number of bursicon- α : R. p: 禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*; A. p: 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XM 001946306.3; N. l: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, AB817240.1; T. c: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, NM 001114307.1; A. g: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, AY735443.1; P. h: 头虱 *Pediculus humanus corporis*, XM 002430737.1; M. d: 家蝇 *Musca domestica*, EF424614.1; D. m: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NM 142726.2; N. v: 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*, NM 001162380.1; M. r: 苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata*, XM 003706607.1; A. m: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NM 001098234.1; A. f: 小蜜蜂 *Apis florea*, XM 003692348.1; H. a: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, KJ002445.1; B. m: 家蚕 *Bombyx mori*, NM 001098375.1; M. s: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, DQ094149.1; D. a: 甲壳纲水蚤 *Daphnia arenata*, EU139431.1; S. p: 棘皮动物紫海胆 *Strongylocentrotus purpuratus*, NM 001110249.1. 黑色阴影表示一致性为 100%, 灰色为 75% ~ 90%, 浅灰为 50% ~ 75%, 白色为 50% 以下; 下标三角形黑点的 11 个半胱氨酸 C 为二硫键结合位点。序列后面百分数表示禾谷缢管蚜 bursicon- α 氨基酸序列与其他物种相应氨基酸序列的一致性。The black shading indicates 100% identity, gray for 75% - 90%, light gray for 50% - 75%, and white for less than 50%. The 11 cysteine C with subscript triangular black spots are binding sites for disulfide bond. The percentage behind the sequences indicates amino acid sequence identity of bursicon- α between *R. padi* and other species.

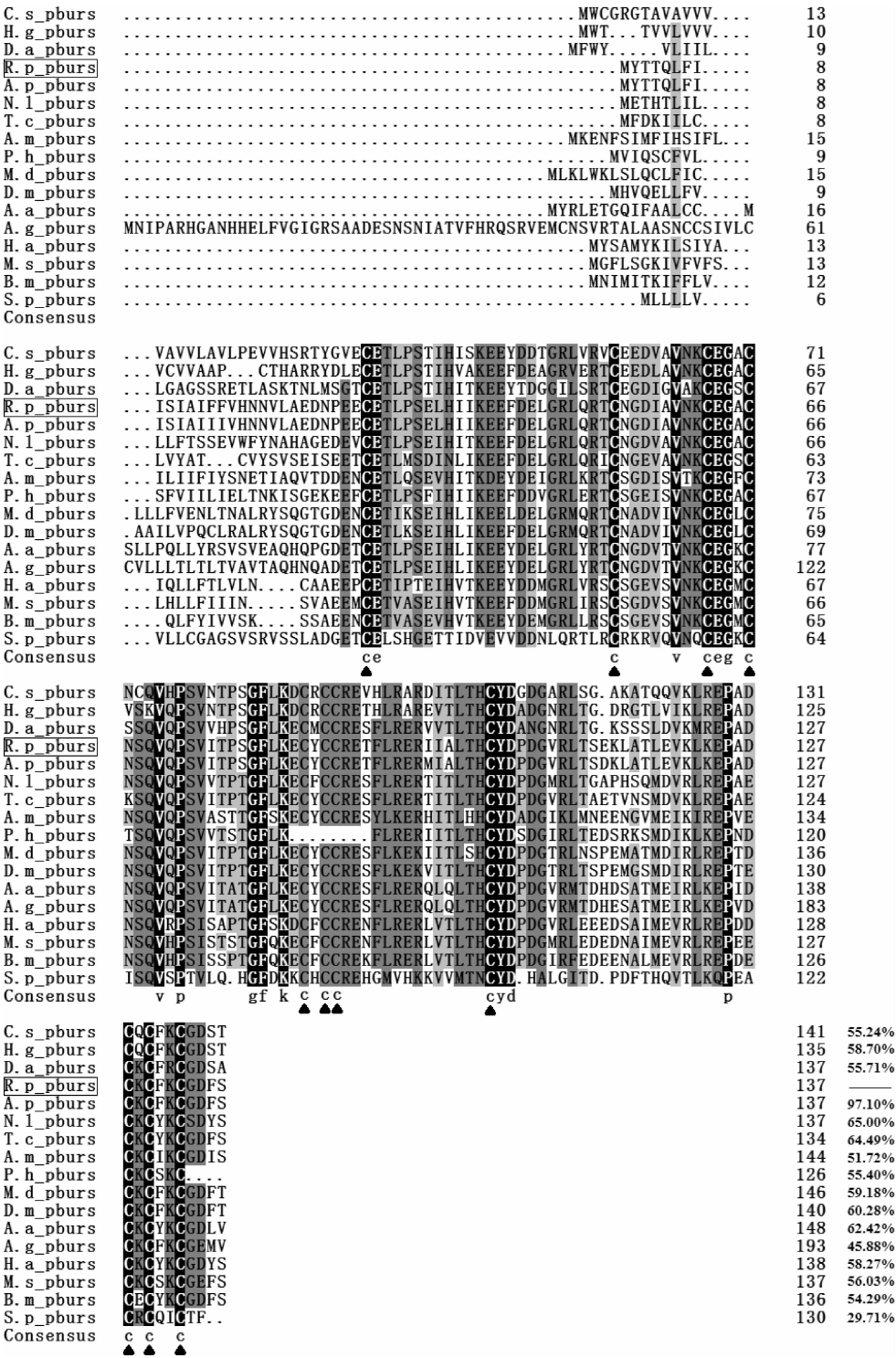


图4 禾谷缢管蚜和其他物种鞣化激素β亚基氨基酸序列的多重联配

Fig. 4 Multiple sequence alignments of amino acid sequences of bursicon-β from *Rhopalosiphum padi* and other species

种名及其鞣化激素β亚基基因 GenBank 序列号 Species name and GenBank accession number of bursicon-β: C. s: 甲壳纲蓝蟹 *Callinectes sapidus*, EU677190.1; H. g: 甲壳纲欧洲龙虾 *Homarus gammarus*, HM113370.1; D. a: 甲壳纲水蚤 *Daphnia arenata*, EU139430.1; R. p: 禾谷缢管蚜 *R. padi*; A. p: 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XM_008181228.1; N. l: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, AB817241.1; T. c: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, NM_001114308.1; A. m: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NM_001040262.2; P. h: 头虱 *Pediculus humanus corpori*, XM_002430736.1; M. d: 家蝇 *Musca domestica*, EF242613.1; D. m: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NM_135868.2; A. a: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XM_001663860.1; A. g: 冈比亚按蚊 *Anopheles Gambiae*, AY823259.1; H. a: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, KJ002446.1; M. s: 烟草天蛾 *Manduca sexta*, DQ291147.1; B. m: 家蚕 *Bombyx mori*, NM_001043824.1; S. p: 棘皮动物紫海胆 *Strongylocentrotus purpuratus*, NM_001110247.1. 黑色阴影表示100%一致, 灰色为75%~90%, 浅灰为50%~75%, 白色为50%以下, 下标三角形黑点的11个半胱氨酸C为二硫键结合位点; 序列后面百分数表示禾谷缢管蚜 bursicon-β 氨基酸序列与其他物种相应氨基酸序列的一致性. The black shading indicates 100% identity, gray for 75% - 90%, light gray for 50% - 75%, and white for less than 50%. The 11 cysteine C with subscript triangular black spots are binding sites for disulfide bond. The percentage behind the sequences indicates the amino acid sequence identity of bursicon-β between *R. padi* and other species.

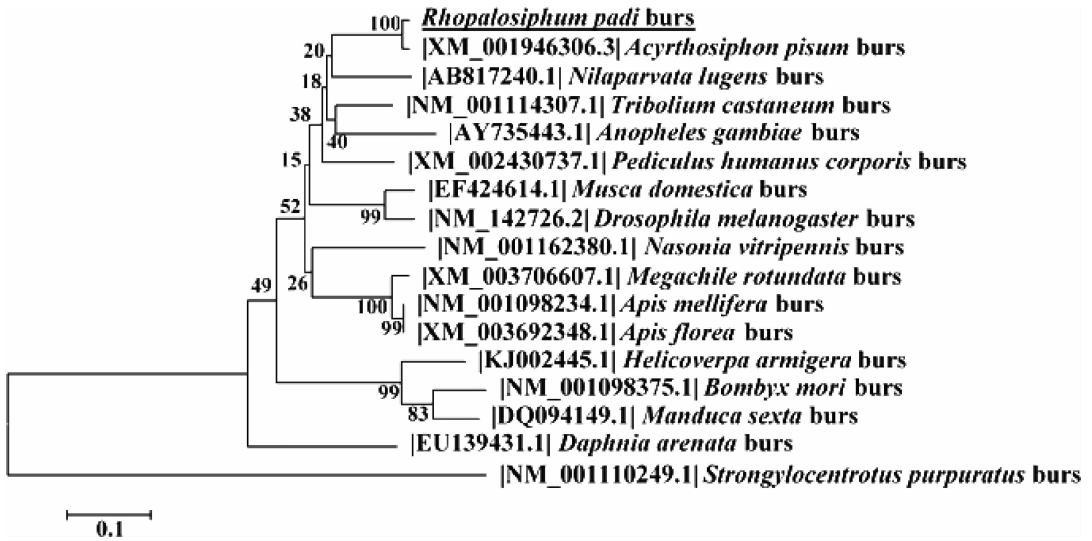


图5 禾谷缢管蚜和其他物种鞣化激素α亚氨基酸序列系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of bursicon-α from *Rhopalosiphum padi* and other species

种名及其鞣化激素α亚基基因 GenBank 序列号 Species name and GenBank accession number of bursicon-α; 禾谷缢管蚜 *R. padi*; 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XM 001946306.3; 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, AB817240.1; 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, NM 001114307.1; 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, AY735443.1; 头虱 *Pediculus humanus corporis*, XM 002430737.1; 家蝇 *Musca domestica*, EF424614.1; 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NM 142726.2; 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*, NM 001162380.1; 苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata*, XM 003706607.1; 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NM 001098234.1; 小蜜蜂 *Apis florea*, XM 003692348.1; 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, KJ002445.1; 家蚕 *Bombyx mori*, NM 001098375.1; 烟草天蛾 *Manduca sexta*, DQ094149.1; 甲壳纲水蚤 *Daphnia arenata*, EU139431.1; 棘皮动物紫海胆 *Strongylocentrotus purpuratus*, NM 001110249.1. 标尺示遗传距离;拉丁文种名前为 GenBank 登录号。Scale bar indicates the genetic distance, and the GenBank accession numbers are before the Latin names.

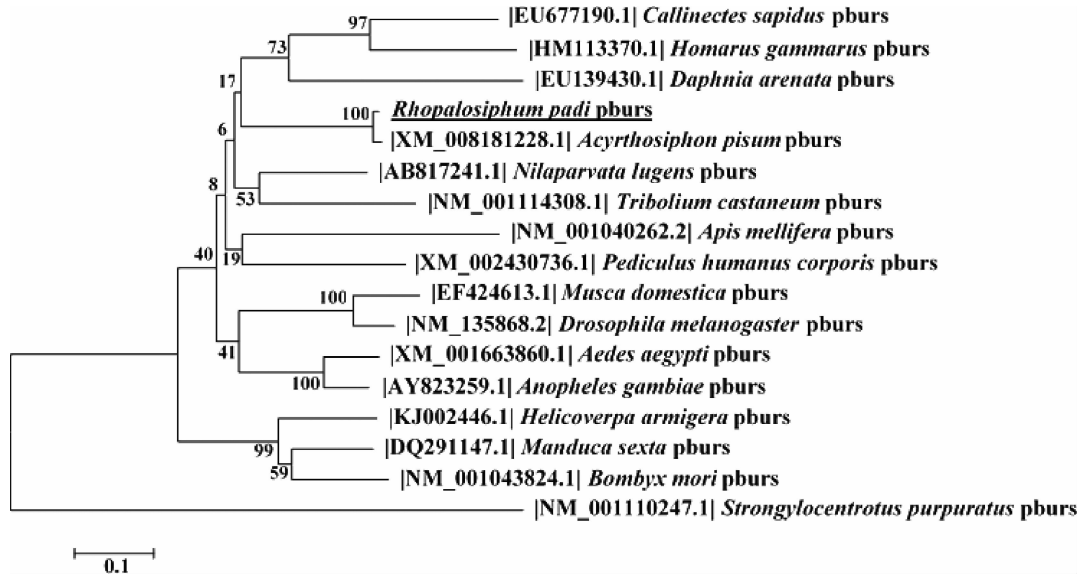


图6 禾谷缢管蚜和其他鞣化激素β亚氨基酸序列系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of bursicon-β from *Rhopalosiphum padi* and other species

种名及其鞣化激素β亚基基因 GenBank 序列号 Species name and GenBank accession number of bursicon-β; 甲壳纲蓝蟹 *Callinectes sapidus*, EU677190.1; 甲壳纲欧洲龙虾 *Homarus gammarus*, HM113370.1; 甲壳纲水蚤 *Daphnia arenata*, EU139430.1; 禾谷缢管蚜 *R. padi*; 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*, XM_008181228.1; 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*, AB817241.1; 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, NM_001114308.1; 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, NM_001040262.2; 头虱 *Pediculus humanus corpori*, XM_002430736.1; 家蝇 *Musca domestica*, EF424613.1; 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NM_135868.2; 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XM_001663860.1; 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, AY823259.1; 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, KJ002446.1; 烟草天蛾 *Manduca sexta*, DQ291147.1; 家蚕 *Bombyx mori*, NM_001043824.1; 棘皮动物紫海胆 *Strongylocentrotus purpuratus*, NM_001110247.1. 标尺示遗传距离;拉丁文种名前为 GenBank 登录号。Scale bar indicates the genetic distance, and the GenBank accession numbers are before the Latin names.

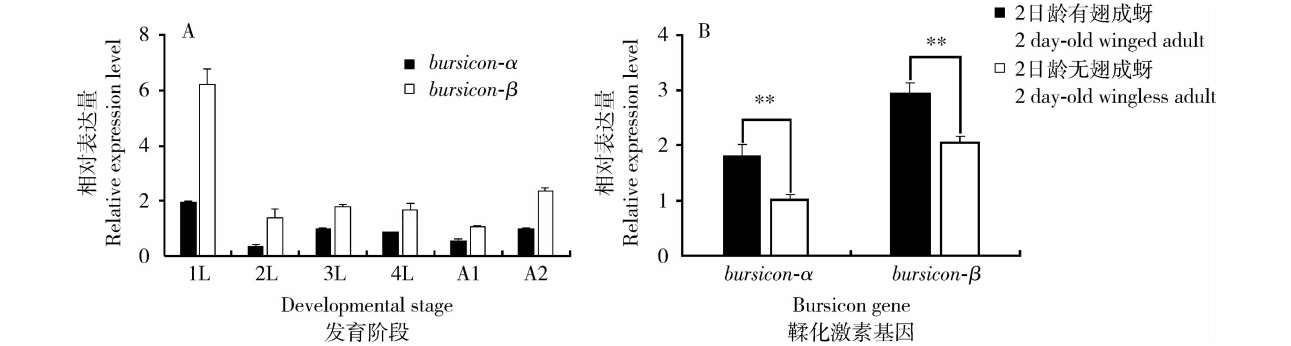


图 7 鞣化激素基因在禾谷缢管蚜不同发育时期(A)和不同翅型成虫(B)中的相对表达量
Fig. 7 Relative expression levels of *bursicon-α* and *bursicon-β* from *Rhopalosiphum padi* in different developmental stages (A) and different morphs of adults (B)

1L: 1 龄若蚜 1st instar nymphs; 2L: 2 龄若蚜 2nd instar nymphs; 3L: 3 龄若蚜 3rd instar nymphs; 4L: 4 龄若蚜 4th instar nymphs; A1: 1 日龄成蚜 1 day-old adult aphids; A2: 2 日龄成蚜 2 day-old adult aphids. 图中数据为平均值 ± 标准差,柱上的双星号表示有翅成虫和无翅成虫间经 *t*-测验差异显著 ($P < 0.01$)。Data in the figure are mean ± *SD*, and the double asterisks above bars indicate very significant difference between the winged adult aphids and wingless adult aphids determined by the Student's *t*-test ($P < 0.01$).

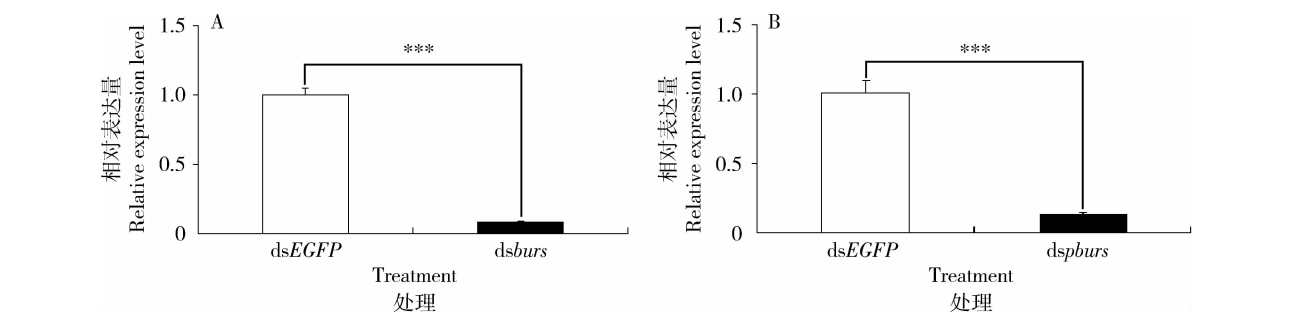


图 8 饲喂含 *dsburs* 或 *dspburs* 的饲料后禾谷缢管蚜鞣化激素 α 亚基(A)和 β 亚基(B)基因的相对表达量
Fig. 8 Effect of feeding the diets containing *dsburs* or *dspburs* on the transcript level of *bursicon-α* (A) and *bursicon-β* (B) from *Rhopalosiphum padi*

图中数据为平均值 ± 标准差,柱上的三星号表示处理和对照间经 *t*-测验差异极显著 ($P < 0.001$)。Data in the figure are mean ± *SD*, and the triple asterisks above bars indicate extremely significant difference between the treatment and the CK determined by the Student's *t*-test ($P < 0.001$).

超景深成像系统观察表明,饲喂 *dsburs* 和 *dspburs* 的禾谷缢管蚜体壁黑化程度与 EGFP 对照组相比明显降低(图 9 和 10)。

3 结论与讨论

昆虫表皮的鞣化是伴随着蜕皮而发生的,在最后一次蜕皮过程中,表皮的合成及鞣化至少受到 6 种激素的协同调控,其中包括促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone, PTTH)、蜕皮激素(molting hormone, MH)、蜕皮激发激素(ecdysis triggering hormone, ETH)、羽化激素(eclosion hormone, EH)、甲壳动物心脏激活肽(crustacean cardioactive peptide, CCAP)和鞣化激素,其中鞣化激素是调控表皮黑化和硬化所必需的(Davis *et al.*,

2007)。
本研究利用转录组测序首次得到了禾谷缢管蚜鞣化激素 α 亚基和 β 亚基 cDNA 的开放阅读框序列。序列分析表明:所得到的鞣化激素与其他昆虫的鞣化激素有较高的序列一致性。例如所得到的禾谷缢管蚜 *bursicon-α* 基因与豌豆蚜 *bursicon-α* 基因氨基酸序列一致性高达 96.86%,与褐飞虱 *bursicon-α* 基因氨基酸序列一致性也达 70.19%;禾谷缢管蚜 *bursicon-β* 基因氨基酸序列与豌豆蚜 *bursicon-β* 基因氨基酸序列一致性高达 97.10%,与褐飞虱 *bursicon-β* 基因氨基酸序列一致性也达 65.00%,这表明所得到的基因为禾谷缢管蚜 *bursicon* 基因。进一步氨基酸序列多重联配分析发现,*bursicon-α* 和 *bursicon-β* 基因的氨基酸序列均极其保守(图 3 和 4),尤其在 CT 结构域中,其保守性尤为明显,更重要的是两个亚基



图 9 禾谷缢管蚜鞣化激素 α 亚基因干涉后表型的变化

Fig. 9 Phenotype after RNAi-mediated knockdown of *bursicon- α* from *Rhopalosiphum padi*

A, C: 饲喂含有 *dsEGFP* 的饲料 Fed with food containing *dsEGFP*; B, D: 饲喂含有 *dsburs* 的饲料 Fed with food containing *dsburs*.

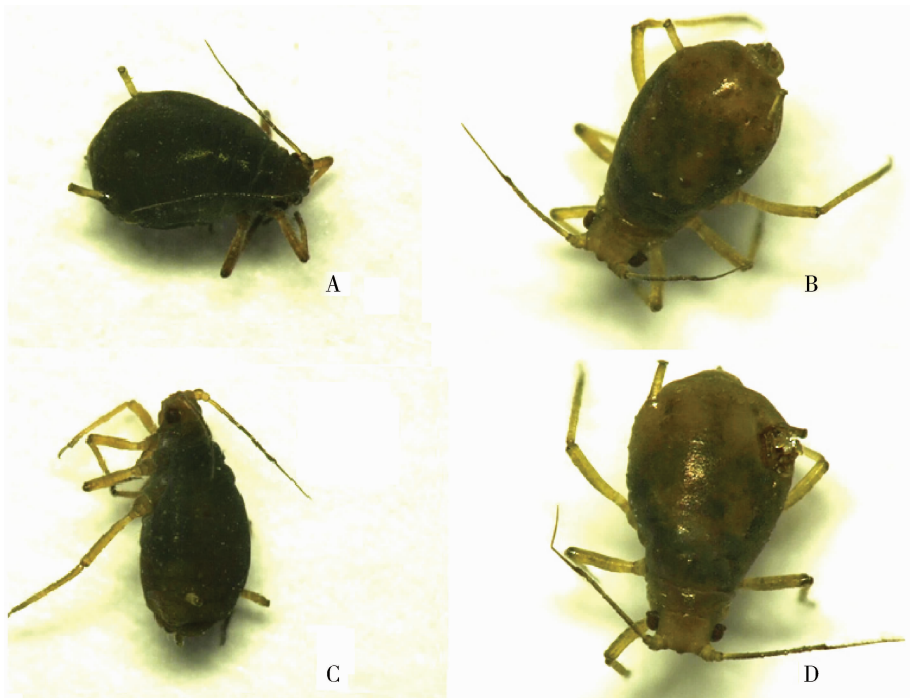


图 10 禾谷缢管蚜鞣化激素 β 亚基因干涉后表型的变化

Fig. 10 Phenotype after RNAi-mediated knockdown of *bursicon- β* from *Rhopalosiphum padi*

A, C: 饲喂含有 *dsEGFP* 的饲料 Fed with food containing *dsEGFP*; B, D: 饲喂含有 *dsburs* 的饲料 Fed with food containing *dsburs*.

都有 11 个半胱氨酸(C)残基,其中 C1-C7, C2-C8, C3-C9, C4-C10 和 C5-C11 之间通过二硫键相连接,中间的 C6 是 2 个亚基共价聚合位点(Luo *et al.*, 2005),其中 C6 和 C7 紧密相连,在 C5 和 C6 以及 C9 和 C10 之间均只隔 1 个氨基酸残基(Vitt *et al.*, 2001),另外这些物种的 *bursicon- α* 基因氨基酸序列

C3 和 C4 以及 C10 和 C11 之间均分别为 C-X-G-X-C (X 为任意氨基酸) 和 C-R-P-C 氨基酸残基(图 3), 而 *bursicon-β* 基因氨基酸序列 C3 和 C4 以及 C10 和 C11 之间均分别为 C-E-G-X-C 和 C-X-X-C (X 为任意氨基酸) 氨基酸残基(图 4)。这更说明鞣化激素两个亚基以二聚体形式起作用(Luo *et al.*, 2005)。An 等(2009)利用在哺乳动物细胞 293T 中表达的双翅目昆虫家蝇的鞣化激素重组蛋白, 注射入头部结扎的果蝇体内, 也能够促使果蝇表皮发生鞣化反应。氨基酸序列比对结果表明, 禾谷缢管蚜、豌豆蚜以及褐飞虱 3 种昆虫鞣化激素基因一致性高达 86% 左右, 推测鞣化激素在半翅目昆虫之间可能具有跨物种活性。

实时荧光定量 PCR 分析结果显示, 鞣化激素 α 亚基、β 亚基基因在禾谷缢管蚜生长发育的各个阶段均有表达(图 7: A), 与其他昆虫的表达结果相似(Huang *et al.*, 2007; An *et al.*, 2009)。这说明鞣化激素除了在成虫中调控表皮的鞣化及翅的伸展外, 在幼虫中也发挥着一定的作用, 但在幼虫中的功能还有待研究。禾谷缢管蚜鞣化激素 α 亚基、β 亚基基因在有翅成蚜中表达量显著高于无翅成蚜(图 7: B)。这可能与鞣化激素调控新羽化成虫翅的伸展有关, 与前人的研究结论一致(Dewey *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Bai and Palli, 2010; Honegger *et al.*, 2011)。

发育表达模式也发现, 禾谷缢管蚜鞣化激素的两个亚基基因均在该蚜虫 1 龄若蚜时期表达量最高(图 7: A), 这个结果与以果蝇、家蝇、家蚕为代表的表达模式有所不同, 在果蝇、家蝇、家蚕等昆虫中鞣化激素 α 和 β 亚基基因均在蛹期表达量最高(Dewey *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008)。这很可能暗示着禾谷缢管蚜鞣化激素在 1 龄若蚜中发挥着更为重要的生理功能。An 等(2012)鉴定了鞣化激素可以调控黑腹果蝇免疫相关基因的表达。在本研究中, 新产出的 1 龄若蚜表皮比较柔软, 免疫防御能力较低, 禾谷缢管蚜 1 龄若蚜鞣化激素表达量高很可能与其调控免疫功能有关。发育表达模式还发现, 在禾谷缢管蚜每个发育时期, β 亚基基因的转录表达量均高于 α 亚基, 类似的现象在灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 中也曾被发现(杨科等, 2012)。既然两个亚基(α 亚基和 β 亚基)通过二硫键相互结合组成鞣化激素发挥作用, 那么两个亚基必然是等量表达的, 但本研究发现两个亚基基因的表达量并不相等, 这暗示着两个亚基

不仅能够组成异源二聚体, 也能组成同源二聚体, 与前人研究结果相似(Luo *et al.*, 2005)。An 等(2012)发现鞣化激素同源二聚体可以通过 IMD 信号途径来调控黑腹果蝇免疫相关基因的表达, 我们发现 β 亚基基因在禾谷缢管蚜 1 龄若蚜中显著高于 α 亚基基因(图 7: A), 这极有可能是 β 亚基组成同源二聚体调控 1 龄若蚜的免疫功能。在本研究中推测存在同源二聚体以及 1 龄若蚜鞣化激素表达量高可能与免疫相关基因表达有关还需深入探讨。

鞣化激素的主要功能是调控表皮的鞣化及翅的伸展。本研究利用 RNAi 技术, 对禾谷缢管蚜鞣化激素两个亚基的基因进行了基因沉默处理, 结果发现, α 和 β 亚基基因表达被降低后禾谷缢管蚜成蚜体壁黑化反应受到显著抑制, 黑化程度明显低于 EGFP 对照组(图 9 和 10), 干涉有效率高达 100%。这一结果表明, 鞣化激素对禾谷缢管蚜成蚜表皮的黑化起着非常重要的作用, 与前人关于鞣化激素功能的描述是一致的(Dewey *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2008; An *et al.*, 2009; 马小丽等, 2013)。但奇怪的是在基因沉默实验中并未发现翅的表型变化, 具体原因尚需进一步研究。

参考文献 (References)

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, *et al.*, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185–2195.
- An S, Dong S, Wang Q, Li S, Gilbert LI, Stanley D, Song Q, 2012. Insect neuropeptide bursicon homodimers induce innate immune and stress genes during molting by activating the NF-κB transcription factor relish. *PLoS ONE*, 7(3): e34510.
- An S, Wang S, Gilbert LI, Beerntsen B, Ellersieck M, Song Q, 2008. Global identification of bursicon-regulated genes in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 9(1): 424.
- An S, Wang S, Stanley D, Song Q, 2009. Identification of a novel bursicon-regulated transcriptional regulator, md13379, in the house fly *Musca domestica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 70(2): 106–121.
- Bai H, Palli SR, 2010. Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. *Dev. Biol.*, 344(1): 248–258.
- Baker JD, Truman JW, 2002. Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuropeptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program. *J. Exp. Biol.*, 205(17): 2555–2565.
- Bradley RHE, 1956. Effects of depth of stylet penetration on aphid transmission of potato virus Y. *Canadian Journal of Microbiology*, 2(6): 539–547.

- Cottrell CB, 1962. The imaginal ecdysis of blowflies. Detection of the blood-borne darkening factor and determination of some of its properties. *J. Exp. Biol.*, 39: 413–430.
- Dai L, Dewey EM, Zitnan D, Luo CW, Honegger HW, Adams ME, 2008. Identification, developmental expression, and functions of bursicon in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, 506(5): 759–774.
- Davis MM, O'Keefe SL, Primrose DA, Hodgetts RB, 2007. A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 134(24): 4395–4404.
- Dewey EM, McNabb SL, Ewer J, Kuo GR, Takanishi CL, Truman JW, Honegger HW, 2004. Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Curr. Biol.*, 14(13): 1208–1213.
- Eriksen KK, Hauser F, Schiott M, Pedersen KM, Sondergaard L, Gimmelikhuijzen CJP, 2000. Molecular cloning, genome organization, developmental regulation, and a knock-out mutant of a novel Leu-rich repeats-containing G protein-coupled receptor (DLGR-2) from *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 10(7): 924–938.
- Fraenkel G, Hsiao C, 1962. Hormonal and nervous control of tanning in the fly. *Science*, 138(3536): 27–29.
- Fraenkel G, Hsiao C, 1965. Bursicon, a hormone which mediates tanning of the cuticle in the adult fly and other insects. *J. Insect Physiol.*, 11(5): 513–556.
- Honegger HW, Estévez-Lao TY, Hillyer JF, 2011. Bursicon-expressing neurons undergo apoptosis after adult ecdysis in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Insect Physiol.*, 57(7): 1017–1022.
- Huang J, Zhang Y, Li M, Wang S, Liu W, Couble P, Zhao G, Huang Y, 2007. RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm. *FEBS Letters*, 581(4): 697–701.
- Kimura K, Kodama A, Hayasaka Y, Ohta T, 2004. Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for post-ecdysial cell death in wing epidermal cells of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 131(7): 1597–1606.
- Li CX, Gao LF, Gao LL, Li RZ, 1997. Study on the rearing of aphids on an artificially holidic diets. *J. Shanxi Agric. Univ.*, 17(3): 225–228. [李彩霞, 高丽锋, 高玲玲, 李润植, 1997. 全纯人工营养液饲养蚜虫的研究. 山西农业大学学报, 17(3): 225–228]
- Li SJ, Wu YQ, Li QS, Liu AZ, Li HS, 2000. Studies on key influencing factors on the dynamics of natural population of *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus). *Plant Protection*, 26(3): 11–14. [李素娟, 武予清, 李巧丝, 刘爱芝, 李鸿胜, 2000. 影响禾谷缢管蚜自然种群变动的关键因素研究. 植物保护, 26(3): 11–14]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Luo CW, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, Honegger HW, Hsueh AJ, 2005. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(8): 2820–2825.
- Ma XL, He WY, You YC, Li XJ, Xu XF, Hu YL, Yang G, You MS, 2013. Cloning and functional analysis of bursicon genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(10): 1101–1109. [马小丽, 何玮毅, 尤燕春, 李晓静, 徐秀凤, 胡玉兰, 杨广, 尤民生, 2013. 小菜蛾鞣化激素基因克隆及功能分析. 昆虫学报, 56(10): 1101–1109]
- Mendive FM, Van Loy T, Claeysen S, Poels J, Williamson M, Hauser F, Gimmelikhuijzen CJP, Vassart G, Vanden Broeck J, 2005. *Drosophila* molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. *FEBS Letters*, 579(10): 2171–2176.
- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, et al., 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190): 949–955.
- Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW, 2000. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam. Horm.*, 60: 1–73.
- Tanaka Y, Suetsugu Y, Yamamoto K, Noda H, Shinoda T, 2014. Transcriptome analysis of neuropeptides and G-protein coupled receptors (GPCRs) for neuropeptides in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Peptides*, 53: 125–133.
- Van Loy T, Van Hiel MB, Vandersmissen HP, Poels J, Mendive F, Vassart G, Vanden Broeck J, 2007. Evolutionary conservation of bursicon in the animal kingdom. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 153(1): 59–63.
- Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJ, 2001. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signal molecules. *Mol. Endocrinol.*, 15(5): 681–694.
- Wang S, An S, Song Q, 2008. Transcriptional expression of bursicon and novel bursicon-regulated genes in the house fly *Musca domestica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 68: 100–112.
- Wilcockson DC, Webster SG, 2008. Identification and developmental expression of mRNAs encoding putative insect cuticle hardening hormone, bursicon in the green shore crab *Carcinus maenas*. *General and Comparative Endocrinology*, 156(1): 113–125.
- Yang K, Xu YP, Dong SZ, Yu XP, 2012. Cloning, sequence analysis and developmental expression of the bursicon gene in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(11): 1255–1263. [杨科, 许益鹏, 董胜张, 俞晓平, 2012. 灰飞虱 Bursicon 基因的克隆、序列分析及在不同发育阶段的表达. 昆虫学报, 55(11): 1255–1263]

(责任编辑: 袁德成)